动 物 学 研 究 2010，Aug. 31(4): 375−380 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2010.04375

基于 *COX I* 基因的太平洋西岸文昌鱼地理种群分析

李伟业，钟 婧，王义权*
（厦门大学 生命科学学院，福建 厦门 361005）

摘要：文昌鱼是进化发育研究的重要模式动物，目前实验材料均采自野外。因此，对其进行正确的物种鉴定和地理种群的遗传分化分析十分必要。该研究扩增并测定了*COX I*基因部分序列，结合NCBI数据库中的*COX I*序列信息，对太平洋西岸文昌鱼的种类和地理种群分化情况进行了分析。结果表明，马来文昌鱼（*Branchiostoma malayanum*）、白氏文昌鱼（*B. belcheri*）和日本文昌鱼（*B. japonicum*）这3个种之间的遗传差异很大，再次证实3个物种的有效性，同时提出应当审慎对待NCBI数据库中文昌鱼的种名标注；太平洋西岸文昌鱼属*Branchiostoma*的3种文昌鱼群体遗传多样性均处于较高水平，同一物种的不同地理种群间没有出现明显的遗传分化，反映了海洋动物的基因交流较容易，不同海域隔离较弱。

关键词：文昌鱼；*COX I* 基因；地理种群；物种
中图分类号：Q959.287; Q349; Q951.3 **文章标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2010)04-0375-06

Analysis of Amphioxus Geographic Populations in the West Pacific Ocean Based on *COX I* Gene

LI Wei-Ye, ZHONG Jing, WANG YI-Quan*
（*School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen* 361005, *China*）

Abstract: Amphioxus (lancelet) is an important model animal in the field of Evo-Devo study. However, the specimens for laboratorial experiments are usually sampled directly from the field. Thus, it is necessary to correctly identify species and evaluate the genetic diversity of geographic populations. In the present investigation, we amplified and sequenced *COX I* gene of amphioxus collected from various localities of the West Pacific Ocean and downloaded all available sequences of the gene from NCBI. Based on those sequences data, we constructed NJ tree to decide the taxonomic status of those amphioxus and performed AMOVA analysis to estimate genetic diversities among geographic populations and individuals. The current results supported the validity of the three amphioxus species, *Branchiostoma malayanum*, *B. belcheri* and *B. japonicum*. We also proposed that some amphioxus species names recorded in NCBI sequence database might be inaccurate. Genetic analysis on the geographic populations of amphioxus species suggested that each examined amphioxus species have a high level of genetic diversity. However, the genetic divergences among geographic populations of the same species are indetectable, indicating a frequent gene flow among them.

Key words: Amphioxus; *COX I* gene; Geographic population; Species

文昌鱼是脊索动物门（Chordata）头索动物亚门（Cephalochordata）中30多种小型动物的统称，它们广泛分布于世界各地的浅海沙滩，营钻沙、底栖和滤食生活，相似生境下的进化趋同性使得该类群不同物种形态特征相似，致使这一物种数并不多的亚门至今仍有一些尚未鉴定的隐种存在（Wang et al, 2004）。另一方面，文昌鱼是一个非常古老的动物类群，大约在5亿多年前即已出现（Shu et al, 1996），这种分布广泛、古老而迁徙力较弱的海洋底栖动物，不同地理种群间有无进一步分化所知甚少。此外，与其它无脊椎动物不同，文昌鱼是现生生物中与脊椎动物亚门（Vertebrata）亲缘关系最近的无脊椎动物，其胚胎发育和躯体结构的基本图式（body plan）与脊椎动物相同，在脊椎动物起源与

收稿日期：2009-12-14；接受日期：2010-04-23
基金项目：国家自然科学基金重点项目（30830023）；教育部高校博士学科点专项科研基金（20070384041）
*通讯作者（Corresponding author）, E-amil: wangyq@xmu.edu.cn
第一作者简介：李伟业（1986–），女，硕士研究生，动物分子遗传专业

进化研究中扮演着非常重要的角色（Stokes et al, 1998; Holland et al, 2001），现在越来越多的人们认识到文昌鱼是一个十分有潜力的新型实验室模式动物（Holland et al, 2004）。然而，在完全实现文昌鱼实验室模式化养殖之前，各地研究者的实验材料均采自野外，因此有必要对文昌鱼物种的正确鉴定和地理种群分化情况进行探讨。

长期以来，分布于太平洋西岸的文昌鱼属（*Branchiostoma*）被视为只有马来文昌鱼（*B. malayanum*）和白氏文昌鱼（*B. belcheri*）两个种；分布在中国青岛和日本海域的文昌鱼，曾作为白氏文昌鱼青岛亚种（*B. belcheri tsingtauense*）（Tchang & Koo, 1936; Nishikawa, 1981）对待。对文昌鱼线粒体细胞色素*b*基因序列的研究发现，日本产的白氏文昌鱼青岛亚种与厦门欧厝所产白氏文昌鱼间的遗传分化已达到种间水平，提议将该亚种提升为种（Wang et al, 2004）。随后，Xu et al（2005）用12S rRNA分子标记结合形态学比较研究了该海域的文昌鱼，结果也支持这一观点；Wang & Fang（2005）通过文献学考证发现，根据命名优先权的原则，*B. belcheri tsingtauense*应订证为*B. japonicum*，进一步的形态学和染色体组型比较再次明确了白氏文昌鱼（*B. belcheri*）和日本文昌鱼（*B. japonicum*）的分类地位（Zhang et al, 2006；Zhang et al, 2009），前者分布于厦门以南直到马来西亚海域；而后者从厦门向北至青岛、日本海域。Chen et al（2007）又在香港采到了白氏文昌鱼、日本文昌鱼和马来文昌鱼。可见每种文昌鱼的分布范围也相当广，但迄今却不知晓同一物种文昌鱼的地理种群间是否已出现了遗传分化。

线粒体细胞色素氧化酶亚基I（*COX I*）基因作为一种常用的DNA分子标记，能很好地反映物种分化情况。Hebert et al（2003）对动物界中除刺胞动物门以外的所有动物，共涵盖11个门1.3 320万个物种的*COX I*基因序列进行分析，发现序列间的差异能很好地区分所有研究物种，认为在动物界*COX I*基因是合适的DNA条形码标准基因。正在进行的国际生命条形码项目（http://www.barcoding.si.edu）也将*COX I*基因作为主要生物条形码的标记。作为一个线粒体基因，*COX I*的进化速率比核基因快，在进行种内遗传分析时，选择线粒体基因比核基因更加有效。在脊椎动物中，近缘种间*COX I*基因通常差异较大（Peng et al, 2008），能够用于衡量物种内的变异情况。因此，本研究将通过*COX I*基因序列的分析进一步探讨太平洋西岸文昌鱼分布和地理种群分化情况。

1 材料和方法

1.1 样本采集

文昌鱼样本分别采自广西北海(B)、广东茂名(M)、山东青岛(Q)、福建厦门(X)海域，其中北海和茂名的样本由南京大学陈均远教授提供，青岛的样本由中科院海洋研究所张培军教授提供，厦门的样本采自厦门欧厝和黄厝海域。所有样本均参照Zhang et al（2006）的分类学描述鉴定种名，样本用“种名缩写+采集地汉语拼音首字母+序号”的方式编号，如采自茂名的白氏文昌鱼（*B. belcheri*）编号为 BbelM3、BbelM4、BbelM5、BbelM6 等。本研究从上述采集地得到的活样本隶属白氏文昌鱼和日本文昌鱼两种：白氏文昌鱼 12 条，其中 3 条采自北海，4 条采自茂名，5 条采自厦门；日本文昌鱼 7 条，其中 3 条采自青岛，4 条采自厦门。

1.2 基因组 DNA 提取和 *COX I* 基因片段扩增

活文昌鱼室内暂养 1~2 日，待其肠内食物排尽后取体后段，匀浆后用常规酚氯仿抽提-乙醇沉淀法提取基因组 DNA。

为了在两个种中有效扩增*COX I*基因片段，我们从GenBank中下载白氏文昌鱼（AY932825）、欧洲文昌鱼（*B. lanceolatum*）（AB194383）、佛罗里达文昌鱼（*B. floridae*）（NC_000834）、日本文昌鱼（DQ407722）、鲁卡偏殖文昌鱼（*Asymmetron lucayanum*）（NC_006464）、马尔代夫侧殖文昌鱼（*Epigonichthys maldivensis*）（NC_006465）等的*COX I*基因序列，比对后参照Kon et al（2006）设计简并引物：AmphL109：5'-ATTCGnGCnGAAyTnTCnCA-GCC-3'和AmphH1325：5'-TCnGAATAyCGnCGw-GGTATnCC-3'，该对引物理论扩增片段长度为1.2 kb。

PCR反应体系为25 μL，含2.5 μL 10×buffer，2 μL dNTP mixture，1 μL基因组DNA，1 μL引物和1.25 U *Taq*酶。反应条件为：首先94℃预变性4 min；再按以下条件进行30个循环：94℃变性40 sec，58℃退火40 sec，72℃延伸70 sec；最后72℃延伸7 min。

1.3 测序和序列分析

PCR 扩增产物用 TIANGEN 离心柱型 DNA 纯

化试剂盒纯化，由上海桑尼生物公司单向测序。鉴于白氏文昌鱼和日本文昌鱼的 *COX I* 基因序列差异较大，分别设计测序引物，白氏文昌鱼为 *COX I*-BF：5'-CTGGAGCTTTGTTAGGTGATG-3'；日本文昌鱼为 *COX I*-JF：5'-GTGCACTTTTGGGTGATGATC-3'。

测序结果用 MEGA3.1 软件（http://www.mega-software.net/）校对后（Tamura et al, 2007; Kumar et al, 2008），与从 NCBI 上下载的文昌鱼 *COX I* 基因序列合并成一个数据矩阵。选择 Kimura 2-parameter 模型（Flook et al, 1999），计算种间和种内遗传距离，用 Neighbor-Joining 法（Saitou et al, 1987）构建系统发育树，Bootstrap 1000 次重复检验。为考察地理种群间的分化，采用 Kimura 2-parameter 模型计算地理种群间和种群内个体间的遗传距离。用 Arlequin ver 3.01（http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/）计算文昌鱼的单倍型多态性和核苷酸多态性指数，以评估其遗传多样性，并进行 AMOVA 分析比较个体间和地理种群间的差异对种群总遗传多样性的贡献度。

2　结　果

2.1　太平洋西岸 *Branchiostoma* 属的文昌鱼种类

PCR 扩增片段约为 1.2 kb，测得上述 19 个样本 *COX I* 基因的 DNA 序列，除去两端测序不准确部分，比对后得到有效同源序列长度为 794 bp（accession number AY932825, HM178949–HM178966），合并 GenBank 数据库中下载的 7 条马来文昌鱼同源序列（accession number AB248225–AB248231）、107 条日本文昌鱼同源序列（accession number AB248118–AB248224）构建系统发育树，结果显示所有样本聚为三个主要分支，其中采自泰国阁科考（Ko Khang Kao）的马来文昌鱼样本形成一支，即第一个分支；采自各地的 12 条白氏文昌鱼聚为第二个分支；而日本文昌鱼聚为第三个分支。文昌鱼样本分属三个独立的物种。

2.2　种间差异和地理种群的遗传分化

按照系统树中的聚类情况，将三个主要分支的序列归为三组，计算种间遗传距离，与种内个体间遗传距离比较。结果显示文昌鱼种间遗传距离为 0.167～0.191，白氏文昌鱼、日本文昌鱼和马来文昌鱼种内个体间平均遗传距离分别为 0.012、0.009 和 0.009，种间遗传距离远大于种内遗传距离。

将所有序列按照物种和地理种群分组，分别计算各种群内和地理种群间的遗传距离（表 1）。结果显示，同种的地理种群内遗传距离在 0.003～0.022 间；白氏文昌鱼三个地理种群间遗传距离为 0.005～0.014，日本文昌鱼六个地理种群间遗传距离为 0.007～0.011，与种群内遗传距离无明显差异；马来文昌鱼来自同一产地，故无地理种群间遗传距离。系统发育树也显示，每一分支内不同地理种群的样本呈现散在分布，没有出现与样本来源地相关的聚类现象（图 1）。

2.3　文昌鱼种群的遗传多样性

分别计算白氏文昌鱼、日本文昌鱼和马来文昌鱼的单倍型多态性指数 h 和核苷酸多态性指数 π，结果显示三种文昌鱼的 h 值都很高（0.9697～1.0000），而 π 值相对偏低（0.008572～0.010686）（表 2）。白氏文昌鱼序列按照采样地分为三个地理种群，进行 AMOVA 分析，结果显示 97.97%的差异来自种群内个体间，只有 2.03%的差异来自地理种群间；同样将日本文昌鱼序列分为六个地理种群，进行 AMOVA 分析，结果显示 98.08%的差异来自种群内个体间，只有 1.92%的差异来自地理种群间（表 3）。由此可见文昌鱼个体差异较大，种群的遗传多样性较高，且个体差异是种群总遗传多样性的主要来源。

3　讨　论

3.1　太平洋西岸文昌鱼的种类

作为国际生命条形码项目的主要分子标记，*COX I* 序列能够很好地区分各个物种，Hebert et al（2003）提出用 *COX I* 序列有效鉴别物种的关键是种间遗传距离必须大于种内遗传距离，且距离差异约为 10 倍，对动物界 11 门一万多个物种分析得出种内遗传距离大多小于 1%，极少大于 2%。本研究对太平洋西岸文昌鱼 133 条 *COX I* 序列的聚类分析表明，这些序列明显地聚成三个分支，提示它们隶属三个独立的物种，三者间的遗传距离约为各自种内遗传距离的 17 倍，比许多脊椎动物同属内物种间差异大了许多；而三种文昌鱼种内个体间遗传距离也在 Hebert et al（2003）提出的范围内。因此，太平洋西岸这三种文昌鱼的种间差异十分明显。

从 NCBI 下载日本文昌鱼同源序列时发现数据库将其种名记为 *Branchiostoma belcheri*，但在来源一项又记载为 Japanese lancelet，这些样本采自

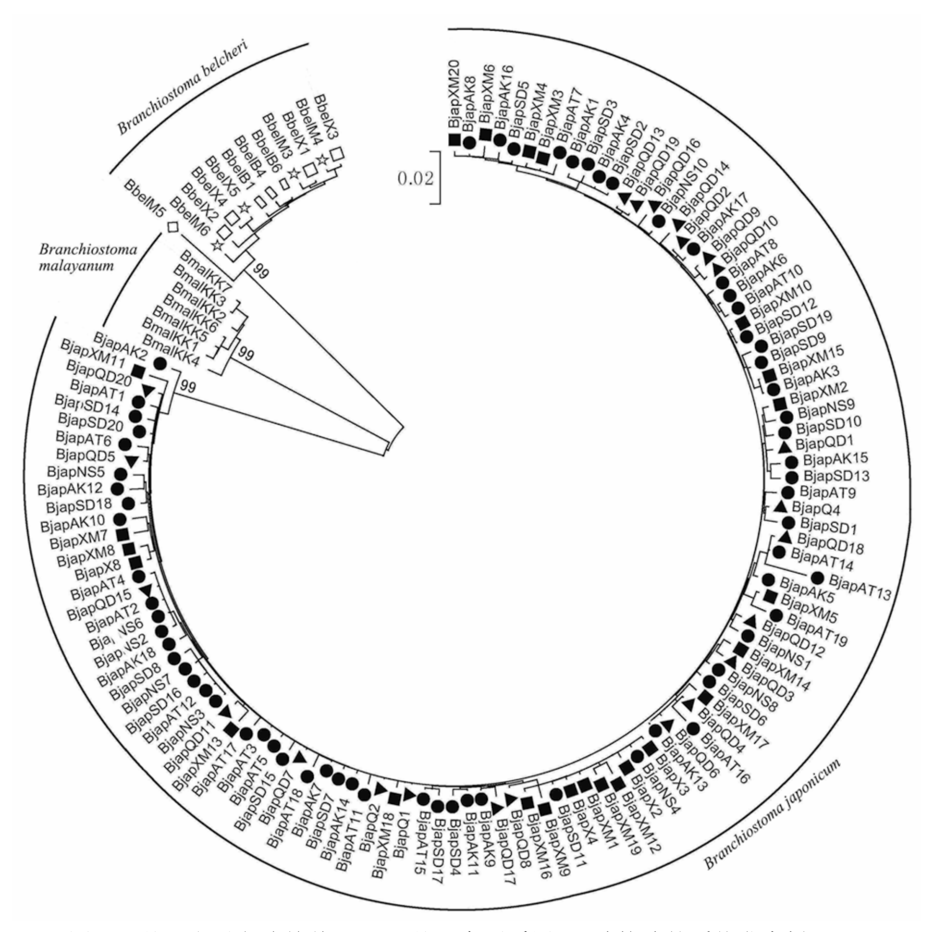


图 1 基于文昌鱼线粒体 *COX Ⅰ* 基因序列采用 NJ 法构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on *COX Ⅰ* gene

图中实心标签为日本文昌鱼，空心标签为白氏文昌鱼，无标签的为马来文昌鱼。不同形状的标签表示不同的采样地。正方形：厦门；星形：茂名；长方形：北海；三角形：青岛；圆形：日本各地。

Solid labels indicate *Branchiostoma japonicum*, hollow bables indicate *B. belcheri*, and *B. malayanum* has no label. Different loci are labeled with different shapes. Square: Xiamen; Pentagram: Maoming; Oblong: Beihai; Triangle: Qingdao; Rotundity: Japan.

表 1 文昌鱼地理种群内和种群间的遗传距离

Tab. 1 Genetic distance within and among amphioxus geographic populations

地理种群 Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.BBBH	**0.003**	0.002	0.002	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015
2.BBMM	0.013	**0.022**	0.002	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015
3.BBXM	0.005	0.014	**0.006**	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015
4.BJQD	0.188	0.192	0.189	**0.006**	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.015
5.BJXM	0.191	0.195	0.192	0.009	**0.010**	0.001	0.001	0.001	0.001	0.015
6.BJAK	0.189	0.193	0.190	0.007	0.010	**0.008**	0.001	0.001	0.001	0.015
7.BJSD	0.189	0.193	0.190	0.007	0.009	0.008	**0.008**	0.001	0.001	0.015
8.BJNS	0.189	0.194	0.190	0.007	0.009	0.008	0.008	**0.008**	0.001	0.015
9.BJAT	0.189	0.193	0.190	0.008	0.011	0.009	0.009	0.009	**0.010**	0.015
10.BMKK	0.173	0.173	0.175	0.166	0.169	0.166	0.166	0.167	0.169	**0.009**

以左上角至右下角的对角线为界，对角线的数值是同一地理种群内个体间的遗传距离，下三角为地理种群间的平均遗传距离，上三角为标准差。1. BBBH：北海的白氏文昌鱼；2. BBMM：茂名的白氏文昌鱼；3. BBXM：厦门的白氏文昌鱼；4. BJQD：青岛的日本文昌鱼；5. BJXM：厦门的日本文昌鱼；6. BJAK：天草（Amakusa）的日本文昌鱼；7. BJSD：西淡（Seidan）的日本文昌鱼；8. BJNS：南势（Nansei）的日本文昌鱼；9. BJAT：渥美（Atsumi）的日本文昌鱼；10. BMKK：泰国阁科考（Ko Khang Kao）的马来文昌鱼。

The values on the diagonal are the genetic distance within geographic population. The values in the lower and upper triangle areas are the genetic distance among geographic populations and SD. 1. BBBH: *B. belcheri* from Beihai; 2. BBMM: *B. belcheri* from Maoming; 3. BBXM: *B. belcheri* from Xiamen; 4. BJQD: *B. japonicum* from Qingdao; 5. BJXM: *B. japonicum* from Xiamen; 6. BJAK: *B. japonicum* from Amakusa; 7. BJSD: *B. japonicum* from Seidan; 8. BJNS: *B. japonicum* from Nansei; 9. BJAT: *B. japonicum* from Atsumi; 10. BMKK: *B. malayanum* form Ko Khang Kao.

表 2　文昌鱼单倍型多态性和核苷酸多态性

Tab. 2　Haplotype diversity and nucleotide diversity of amphioxus

群体 Population	*h*	*π*
B. belcheri	0.9697±0.0443	0.010686±0.005989
B. japonicum	0.9974±0.0020	0.008572±0.004504
B. malayanum	1.0000±0.0764	0.008636±0.005303

h：单倍型多态性（Haplotype diversity）；*π*：核苷酸多态性（Nucleotide diversity）。

表 3　文昌鱼 AMOVA 分析结果

Tab. 3　AMOVA analysis of *B. belcheri* and *B. japonicum* populations

种名 Species	变异来源 Source of variation	自由度 *df*	方差总和 Sum of squares	贡献率 Variance（%）	固定指数 Fixation index
B. belcheri	种群间 Among population	2	9.341	2.03	FST: 0.02026
	种群内 Within population	8	34.750	97.97	
B. japonicum	种群间 Among population	5	22.909	1.92	FST: 0.01923
	种群内 Within population	108	361.644	98.08	

日本天草（Amakusa）、西淡（Seidan）、南势（Nansei）、渥美（Atsumi）等海域，但我们的分析结果再次表明，实际上它们的种名应为 *Branchiostoma japonicum*。关于太平洋西岸 *Branchiostoma* 种类的问题，Zhang et al（2006）有过详细的描述，随后的一些研究也证实 *B. belcheri* 和 *B. japonicum* 分属两个独立的物种（Chen et al, 2007; Zhang et al, 2009; Zhong et al, 2009）。然而，直到撰写此文，我们再次登录 NCBI 数据库时，发现仍有许多源自日本和中国青岛的文昌鱼种名记为 *B. belcheri*，下载其中部分序列比较发现，这些物种的正确种名应为 *B. japonicum*，提醒我们使用 NCBI 中序列数据时应当审慎地对待其种名标注，用前首先需查验物种种名是否正确。

3.2　太平洋西岸三种文昌鱼的分布和遗传多样性

我们采集和下载的样本分别来自广西北海、广东茂名、山东青岛、福建厦门，泰国阁科考和日本天草、西淡、南势、渥美海域。就这九个样品来源地看，日本文昌鱼在我国厦门、青岛和日本天草、西淡、南势、渥美分布；白氏文昌鱼在北海、茂名、厦门分布，在青岛和日本海域没有发现，因此其分布区域应在厦门以南；马来文昌鱼则分布在泰国阁科考。此外，Chen et al（2007）在香港采集到了马来文昌鱼和日本文昌鱼，因此这两种文昌鱼在中国香港海域也有分布，但我们在北海和茂名的样本中均未发现日本文昌鱼。Cao et al（2001）和 Zhu et al（2003）等曾报道在河北昌黎、山东威海等海域采到过文昌鱼，因此我们推测日本文昌鱼的分布范围应当自香港向中国的东南沿海伸展，至勃海湾直到日本海域。

在文昌鱼地理种群分化问题上，基于*COX I*基因的系统发育树，遗传距离和AMOVA分析结果均显示，采自厦门、北海、茂名的白氏文昌鱼没有明显分化，而我国青岛、厦门和日本天草、西淡、南势、渥美的日本文昌鱼也没有明显分化。这种现象可能与文昌鱼幼体在一个多月的浮游期中随洋流运动迁徙有关，反映了不同海域的海洋动物地理隔离较弱，地理种群间的基因交流较容易。文昌鱼群体的单倍型多态性极高，这种现象在海洋鱼类中普遍存在（Atarhouch et al, 2006）；而其核苷酸多样性指数*π*值与日本鳀、白姑鱼等其他广布于西太平洋的物种相当（Liu et al, 2006; Han et al, 2008）。总的来说，太平洋西岸文昌鱼属*Branchiostoma* 三种文昌鱼群体的遗传多样性均处于较高水平，同一物种的不同地理种群间没有出现遗传分化。

参考文献：

Atarhouch T, Ruber L, Gonzalez EG. 2006. Signature of an early genetic bottleneck in a population of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*)[J]. *Mol Phylogenet Evol*, **39**(2): 373-383.

Cao YP, Yan LN, Xie S, Liu Z. 2001. Preliminary investigation of amphioxus in Changli[J]. *Chn J Zool*, **63**(3): 10-13. [曹玉萍，闫路娜，谢 松，刘 震. 2001. 昌黎海区文昌鱼初步调查. 动物学杂志, **63**(3): 10-13.]

Chen Y, Cheung SG, Kong RYC, Shin PKS. 2007. Morphological and molecular comparisons of dominant amphioxus populations in the China Seas[J]. *Mar Biol*, **153**: 189-198.

Flook PK, Klee S, Rowell CHF. 1999. Combined molecular analysis of the Orthoptera and implications for their higher systematics[J]. *Syst Biol*, **48**(2): 233-253.

Han Z, Gao T, Yanagimoto T. 2008. Deep phylogeographic break among white croaker *Pennahia argentata* (Sciaenidae, Perciformes) populations in North-western Pacific[J]. *Fish Sci*, **74**: 770-780.

Holland LZ, Holland ND. 2001. Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate?[J]. *J Anat*, **199**: 85-98.

Holland LZ, Laudet V, Schubert M. 2004. The chordate amphioxus: an energing model organism for developmental biology[J]. *Cell Mol Life Sci*, **61**: 2290-2308.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL. 2003. Biological identification through DNA barcodes[J]. *Proc Roy Soc B：Biol Sci*, **270**: 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proc Roy Soc B：Biol Sci*, **270**: 96-99.

Kon T, Nohara M, Nishida M, Sterrer W, Nishikawa T. 2006. Hidden ancient diversification in the circumtropical lancelet *Asymmetron lucayanum* complex[J]. *Mar Biol*, **149**: 875-883.

Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. *Brief Bioinform*, **9**: 299-306.

Liu JX, Gao TX, Zhuang ZM. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*)[J]. *Mol Phylogenet Evol*, **40**(3): 712-723.

Nishikawa T. 1981. Consideration on the taxonomic status of the lancelets of the genus *Branchiostoma* from the Japanese waters[J]. *Publ Seto Mar Biol Lab*, **26**: 135-156.

Peng JL, Wang XZ, He SP. 2008. The progress and application of DNA barcoding[J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **32**(06): 916-919. [彭居俐, 王绪桢, 何舜平. 2008. DNA 条形码技术的研究进展及其应用. 水生生物学报, **32**(06): 916-919.]

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, **4**: 406-425.

Shu DG, Morris SC, Zhang XL. 1996. A Pikaia-like chordate from the Lower Cambrian of China[J]. *Nature*, **384**: 157-158.

Strokes MD, Holland ND. 1998. The lancelet: Also known as "amphioxus", this curious creature has returned to the limelight as a player in the phylogenetic history of the vertebrates[J]. *Am Sci*, **86**: 552-560.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, **24**: 1596-1599.

Tchang S, Koo KC. 1936. Description of a new variety of *Branchiostoma belcheri* Gray from Kiaochow Bay, Shantung, China[J]. *Contrib Inst Zool Nat Acad Peiping*, **3**(4): 77-114.

Wang YQ, Xu QS, Peng XX, Zhou HT. 2004. Taxonomic status of amphioxus *Branchiostoma belcheri* in Xiamen beach estimated by homologous sequence of Cyt *b* gene[J]. *Acta Zool Sin*, **50**(2): 202-208. [王义权, 许群山, 彭宣宪, 周涵韬. 2004. 通过 Cyt *b* 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位. 动物学报, **50**(2): 202-208.]

Wang YQ, Fang SH. 2005. Taxonomic and molecular phylogenetic studies of amphioxus: a review and prospective evaluation[J]. *Zool Res,* **26**(6): 666-672. [王义权, 方少华. 2005. 文昌鱼分类学研究及展望. 动物学研究, **26**(6): 666-672.]

Xu QS, Ma F, Wang YQ. 2005. Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters[J]. *J Exp Zool Part B*: *Mol Dev Evol*, **304**: 259-267.

Zhong J, Zhang QJ, Xu QS, Schubert M, Laudet V, Wang YQ. 2009. Complete mitochondrial genomes defining two distinct lancelet species in the West Pacific Ocean[J]. *Mar Biol Res*, **5**: 278-285.

Zhang QJ, Zhong J, Fang SH and Wang YQ. 2006. *Branchiostoma japonicum* and *B. belcheri* are distinct lancelets (Cephalochordata) in Xiamen waters in China[J]. *Zool Sci*, **23**: 573-579.

Zhang QJ, Li G, Sun Y, Wang YQ. 2009. Chromosome preparation and preliminary observation of two amphioxus species in Xiamen[J]. *Zool Res*, **30**(2): 131-136.

Zhu X, Xia L, Song S, Yu XZ, Zhai K. 2003. *Branchiostoma belcheri* found in the coastal waters of Weihai[J]. *Mar Sci*, **27**(9): 6-7. [祝 茜，夏 龙，宋 帅，于希忠，翟 奎. 2003. 威海海域发现文昌鱼. 海洋科学, **27**(9): 6-7.]